

靶向蛋白 S-棕榈酰化修饰在 T 细胞免疫疗法中的研究进展

孙丽婷^{1,2}, 张为国², 童玥^{1*}

(¹ 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198; ² 中国医学科学院北京协和医学院苏州系统医学研究所, 苏州 215123)

摘要 S-棕榈酰化是细胞内一种可逆且动态的蛋白质翻译后修饰, 参与调控下游靶基因转录、表达以及信号转导, 进而影响细胞生命活动。研究发现数千种人类蛋白质经历 S-棕榈酰化修饰, 表明 S-棕榈酰化与疾病发生发展以及治疗之间存在很大程度的关联性。T 细胞是机体抗肿瘤免疫的主力军, 多种 T 细胞免疫相关蛋白受 S-棕榈酰化调节。本文围绕 S-棕榈酰化对 T 细胞信号转导的影响及在 T 细胞免疫疗法中的应用展开论述, 为 T 细胞免疫治疗新靶点及多肽抑制剂的开发提供新思路。

关键词 S-棕榈酰化; DHHC; T 细胞; 免疫疗法; 肽抑制剂

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)01-0045-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023112903

引用本文 孙丽婷, 张为国, 童玥. 靶向蛋白 S-棕榈酰化修饰在 T 细胞免疫疗法中的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(1): 45–52.

Cite this article as: SUN Liting, ZHANG Weiguo, TONG Yue. Research progress on targeted protein S-palmitoylation modification in T cell immunotherapy[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(1): 45–52.

Research progress on targeted protein S-palmitoylation modification in T cell immunotherapy

SUN Liting^{1,2}, ZHANG Weiguo², TONG Yue^{1*}

¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ²Suzhou Institute of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Suzhou 215123, China

Abstract S-palmitoylation, a reversible and dynamic post-translational modification in cells, is involved in regulating the transcription and expression of downstream target genes as well as signal transduction, thereby affecting cell life activities. Studies have shown that thousands of human proteins undergo S-palmitoylation modification, suggesting that S-palmitoylation is closely related to the progression and treatment of diseases. T cells play central roles in anti-tumor immune responses. A variety of T cell immune-related proteins are regulated by S-palmitoylation. In the present study, we focus on the impact of S-palmitoylation on T cell signal transduction and its application in T cell immunotherapy, aiming to provide new ideas for the development of new targets and peptide inhibitors for T cell immunotherapy.

Key words S-palmitoylation; DHHC; T cells; immunotherapy; peptide inhibitors

S-棕榈酰化最初于 20 世纪 80 年代被发现, 是存在于所有真核生物中的高度保守的蛋白质翻译后修饰, 介导十六碳脂肪酰基通过不稳定的硫酯键连接到目的蛋白的半胱氨酸侧链上^[1]。在哺乳动物中, S-棕榈酰化由 23 种命名为 DHHC1~DHHC24 (除 DHHC10) 的棕榈酰基转移酶催化^[2], 其催化核心内具有共同的 DHHC(Asp-His-His-Cys) 基序。

DHHC 蛋白是具有至少 4 个跨膜螺旋的整合膜蛋白, 它们具有不同的膜定位, 其中一些主要在质膜中(DHHC5, DHHC20, DHHC23), 一些主要在内质网中(DHHC1, DHHC6, DHHC11, DHHC24), 还有一些主要在高尔基体中(DHHC3, DHHC7, DHHC15 和 DHHC18), 除此之外的 DHHC 具有多个膜定位^[3]。跨膜结构域胞质末端的半胱氨酸残基通常为棕榈

酰化位点^[4]。棕榈酰基首先从棕榈酰-CoA 转移到 DHHC 基序中的保守半胱氨酸残基上, 最终转移到底物蛋白的半胱氨酸残基上^[5]。S-棕榈酰化可以被脱棕榈酰化酶逆转。已知的几种脱棕榈酰化酶均属于丝氨酸水解酶家族, 包括酰基蛋白硫酯酶 (acyl-protein thioesterase, APT) 和棕榈酰蛋白硫酯酶 (palmitoyl protein thioesterase, PPT), 它们可以除去递送至溶酶体进行降解的蛋白质的棕榈酰基^[6]。

1 T 细胞免疫相关蛋白棕榈酰化调控 T 细胞活化

S-棕榈酰化对蛋白质的影响是多方面的。依赖于棕榈酰基显著的疏水性, S-棕榈酰化最常见也是最直接的作用是促进底物蛋白的膜定位。泛素化可以促进蛋白质从细胞表面逆行转运至细胞内部^[7], 而 S-棕榈酰化则在相反的方向上驱动多种重要的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 信号转导相关蛋白定位至膜或膜内脂筏^[8]。S-棕榈酰化也会影响蛋白质稳定性, 通常认为其调控的不是蛋白表达, 而是蛋白靶向溶酶体的降解^[9]。此外, S-棕榈酰化还会影响蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 和蛋白质聚集。免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, CoIP) 实验结果显示, 棕榈酰化缺陷的细胞内 DHHC21 与淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Lck) 的相互作用明显减弱。DHHC 蛋白家族成员几乎都参与疾病发生和发展, 在多种免疫和神经相关蛋白功能调控中发挥关键作用, 最近也有研究表明脂质代谢和糖代谢也受到棕榈酰化修饰调控^[10]。

1.1 TCR 信号通路相关蛋白

T 细胞在适应性免疫应答中发挥重要作用, 不仅介导抗原特异性细胞免疫, 还协助 B 细胞产生抗体, 辅助免疫系统的其他细胞发挥功能。T 细胞的发育和活化需要 TCR 信号转导^[11]。TCR 识别并结合其配体多肽/主要组织相容性复合物 (peptide/major histocompatibility complex, pMHC), 随后 TCR/CD3 复合物、辅助分子 (CD4/CD8、CD2 和 CD28 等) 以及与 TCR/CD3 分子胞质区相关联的蛋白激酶 (Lck 和 Fyn 等) 聚集形成免疫突触, 导致 Src 和 Syk 家族蛋白酪氨酸激酶启动 TCR 信号转导级联, T 细胞被活化。免疫突触中的 CD4 或 CD8 募集 Lck, 其磷酸化 TCR/CD3 复合物 ζ 链中基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (immunoreceptor tyrosine-

based activation motifs, ITAMs) 内的两个酪氨酸残基^[12]。双重磷酸化的 ITAMs 招募 ζ 链相关蛋白激酶 -70 (zeta-chain-associated protein kinase-70, Zap-70) 至 TCR/CD3 复合物。与 ITAMs 的结合触发 Zap-70 构象变化, 使得其更容易在 Y319 被 Lck 磷酸化, 随后导致 Zap-70 完全活化^[13]。活化的 Zap-70 从 ITAMs 释放, 磷酸化两个重要的衔接分子 T 细胞活化连接子 (linker for activation of T cells, LAT) 和包含 SH2 结构域的 76 kD 白细胞磷酸化蛋白 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kD, SLP-76)^[14]。LAT 和 SLP-76 的磷酸化使下游很多信号蛋白组装成复合物, 进一步传导 TCR 信号。包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、白细胞介素-2 诱导的 T 细胞激酶 (interleukin-2-inducible T-cell kinase, Itk)、鸟嘌呤核苷酸转化因子家族成员 Vav1、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和磷脂酶 C γ 1 (phospholipase C gamma1, PLC γ 1) 在内的许多下游蛋白激酶被激活^[11], 触发胞质内钙离子从内质网释放、与 T 细胞活化和细胞增殖等相关的转录应答^[15] (如图 1), 以及幼稚 CD4⁺ T 细胞分化成不同的辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 亚群, 如 Th1 和 Th2 谱系。

研究发现, TCR 信号转导途径中的多个关键蛋白受 S-棕榈酰化调节。

1.1.1 CD4 CD4 在 T 细胞活化中作为 TCR 的共受体, 通过其胞外结构域与 MHC II 类分子的非多态性区域结合, 稳定 TCR 与其配体之间的相互作用^[16]。此外, CD4 还通过其胞内结构域和 Lck 相互作用增强信号传导。Fragoso 等^[17]发现 T 细胞中 CD4 在两个膜近端半胱氨酸残基 Cys396 和 Cys399 处发生特异性棕榈酰化。棕榈酰化位点 (Cys396 和 Cys399) 和 Lck 结合位点 (Cys422 和 Cys424) 负责 CD4 在脂筏中的定位, 这两处位点突变的 CD4 在脂筏中的定位都明显减少, 同时突变则导致 CD4 基本上不存在于脂筏中, 表明棕榈酰化修饰和与 Lck 的相互作用有助于 CD4 在脂筏中的富集。CD4 的脂筏定位也影响其增强 CD3 诱导的酪氨酸磷酸化的能力。OKT3 和 OKT4 共刺激野生型和表达 CD4 突变体的 Jurkat T 细胞后用抗 pTyr 抗体检测, 实验结果表明两种 CD4 突变体增强 CD3 诱导的酪氨酸磷酸化的能力降低。

1.1.2 Lck Lck 是第一批被鉴定出可以发生 S-棕

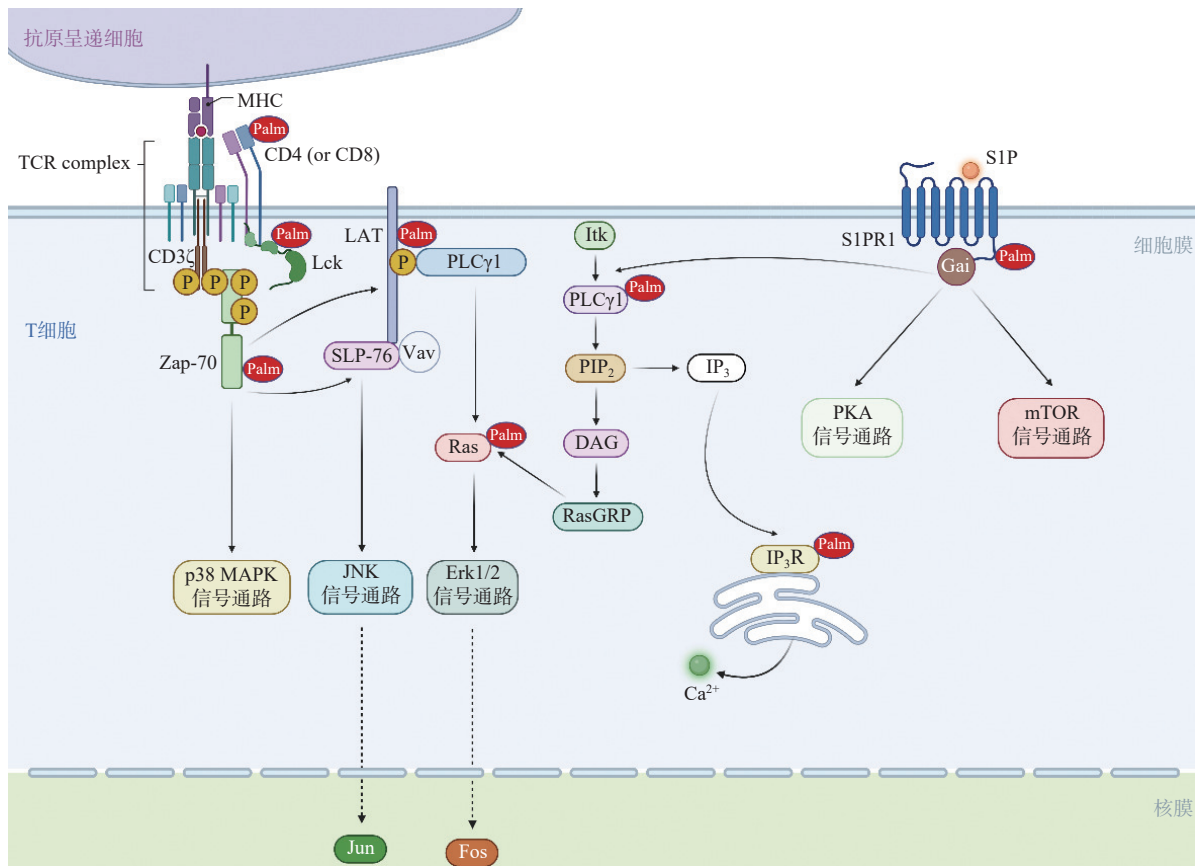


图 1 TCR 信号通路和 GPCR 信号通路

TCR 信号通路和 GPCR 信号通路中的多种关键蛋白可以发生棕榈酰化, 调控 T 细胞活化。“P”代表可发生磷酸化, “Palm”代表可发生棕榈酰化。TCR complex: T 细胞受体复合物; MHC: 主要组织相容性复合物; Lck: 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶; Zap-70: ζ 链相关蛋白激酶-70; p38 MAPK: p38 丝裂原活化蛋白激酶; LAT: T 细胞活化连接子; PLC γ 1: 磷脂酶 C γ 1; Vav: 鸟嘌呤核苷酸转化因子; SLP-76: 包含 SH2 结构域的 76 kD 白细胞磷酸化蛋白; JNK: Jun 氨基末端激酶; Jun: 活化蛋白-1 转录复合物成员; Ras: 大鼠肉瘤蛋白; Erk1/2: 细胞外调节蛋白激酶 1/细胞外调节蛋白激酶 2; Fos: 活化蛋白-1 转录复合物成员; Itk: 白细胞介素-2 诱导的 T 细胞激酶; PIP $_2$: 磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸; IP $_3$: 肌醇 1, 4, 5-三磷酸; DAG: 二酰基甘油; RasGRP: Ras 鸟嘌呤核苷酸释放蛋白; IP $_3$ R: 肌醇 1, 4, 5-三磷酸受体; SIP: 鞘氨醇-1-磷酸; SIPRI: 鞘氨醇-1-磷酸受体; Gai: 抑制型 G 蛋白; PKA: 蛋白激酶 A; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

棕榈酰化的哺乳动物蛋白质之一。研究表明 Lck 在 Cys3 和 Cys5 被棕榈酰化^[18]。Lck 的棕榈酰化对于其催化活性是可有可无的, 但对于其靶向质膜、传导 TCR 信号及介导 T 细胞活化至关重要^[8]。Fan 等^[19]使用酰基树脂辅助捕获 (acyl resin-assisted capture, Acyl-RAC) 方法证明了 Ca²⁺ 依赖性蛋白酰基转移酶 DHHC21 在质膜处特异性棕榈酰化 Lck, 探究了其在 TCR 信号转导中的重要作用。DHHC21 的表达缺陷不影响总蛋白质表达水平, 但阻止关键 T 细胞信号蛋白的 S-棕榈酰化, Lck 和 Fyn 的棕榈酰化水平显著降低。TCR 信号转导和 T 细胞活化标记物的表达被抑制, 几种关键信号转导蛋白的磷酸化水平降低, CD25 和 CD69 表达丧失, 钙流通和 IL-2 分泌也受到抑制。DHHC21 对于鼠幼稚 CD4⁺ T 细

胞分化成 Th1 和 Th2 辅助性 T 细胞也是必需的。

1.1.3 Zap-70 非受体酪氨酸激酶 Zap-70 是 T 细胞免疫应答所必需的酪氨酸激酶。Zap-70 缺陷的 T 细胞中, LAT 和 SLP-76 的磷酸化受损, LAT 信号蛋白复合物的组装被抑制, 下游信号级联的激活被削弱^[20]。在静息 Jurkat T 细胞中, 研究人员使用酰基-生物素交换法 (acyl-biotinyl exchange, ABE) 证实了 Zap-70 在激酶结构域 Cys564 发生 TCR 依赖性的棕榈酰化^[21]。OKT3 刺激 T 细胞导致 Zap-70 的 S-棕榈酰化增加, 在刺激后约 2 min 达到峰值。棕榈酰化不影响 Zap-70 的质膜定位和稳定性, 对于其激酶活性也不是必需的, 但对于其与底物的相互作用和传导 TCR 信号是必不可少的。Zap-70 的 C564R 酰化缺陷型突变体与 Lck 的相互作用延长, 免疫共

沉淀显著增加,导致 Zap-70 磷酸化水平与野生型相比增加了近 250 倍。然而,该酰化缺陷型突变体不能磷酸化 LAT 和 SLP-76,导致 TCR 信号传导链的破坏,T 细胞活化和 T 细胞表面标志物表达显著降低。Zap-70^{-/-}小鼠胸腺发育表现出严重的阳性选择缺陷,T 细胞发育阻滞在双阳(double positive, DP)阶段^[22]。Zap-70 的表达和功能的改变与许多人类疾病相关,包括免疫缺陷、自身免疫和白血病,但 Zap-70 的棕榈酰基转移酶尚未被鉴定。

1.1.4 LAT LAT 是调节 T 细胞发育和功能的关键接头分子。它定位在质膜,传递 TCR 刺激引发的近端信号从而在 T 细胞活化中起到重要作用。LAT 在胞内结构域具有两个保守的近膜半胱氨酸(Cys26 和 Cys29),在该半胱氨酸残基处 LAT 被双重 S-棕榈酰化。虽然 LAT 可以凭借其跨膜结构域定位到质膜,但 Cys26 和 Cys29 的棕榈酰化对于其定位到膜内脂筏是不可或缺的。棕榈酰化也是 LAT 被磷酸化所必需的,OKT3 刺激 Jurkat T 细胞后,用抗 pTyr 抗体检测到 C26A、C29A 和 C26/29A 突变体仅有非常弱的酪氨酸磷酸化^[23]。VAMP7 是一种可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感蛋白附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide-sensitive protein-attachment protein receptor, SNARE),通过调节囊泡 LAT 的募集和磷酸化来控制 T 细胞活化^[24]。VAMP7 可以在 Cys183 处被高尔基体中的 DHHC18 棕榈酰化,突变 Cys183 会使较多的 VAMP7 不能定位到高尔基体,而是定位在囊泡,并且在 T 细胞活化时不能运输至免疫突触。这一错误定位可能影响 T 细胞下游信号事件,例如信号蛋白的极化运输或细胞迁移^[25]。

1.1.5 PLC γ 1 钙离子内流是 T 细胞活化的关键标志。钙离子信号通路的关键蛋白 PLC γ 1 被 Itk 激活后,将磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂)分解为二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)和肌醇 1, 4, 5-三磷酸(inositol 1,4,5-trisphosphate, IP₃)。DAG 激活大鼠肉瘤(rat sarcoma, Ras)信号通路,而 IP₃ 与其在内质网膜上的受体 IP₃R 结合,触发内质网释放 Ca²⁺。研究表明,PLC γ 1 可被 DHHC21 棕榈酰化,并由 TCR 信号传导动态调节^[19]。IP₃R 可被 DHHC6 棕榈酰化,Cys56、Cys849 和 Cys2214 为潜在的棕榈酰化位点。棕榈酰化稳定 IP₃R 的蛋白表达,DHHC6 敲低导致 IP₃R 蛋白水

平降低,Ca²⁺内流减少^[26]。棕榈酰化对 PLC γ 1 和 IP₃R 蛋白的具体影响以及在钙信号传导中的调控机制还需要进一步研究。

1.2 GPCR 信号通路相关蛋白

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)信号传导对于免疫细胞趋化性至关重要,调控单核细胞迁移到感染部位以及 T 细胞和抗原呈递细胞迁移到引流淋巴结中等^[27]。鞘氨醇-1-磷酸受体(sphingosine-1-phosphate receptor 1, S1PR1)是 GPCR 家族成员之一,通过与其配体鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)结合激活下游信号通路。S1P/S1PR1 信号传导通路在免疫细胞的发育过程中发挥重要作用,如影响成熟 T 细胞从胸腺流出进入血液和外周免疫器官,也与包括动脉粥样硬化和多发性硬化等在内的多种疾病相关^[28]。研究发现 S1PR1 在其胞内结构域的 3 个半胱氨酸残基 Cys328、Cys329 和 Cys331 被 DHHC5 棕榈酰化,棕榈酰化可以促进 S1PR1 与抑制型 G 蛋白(inhibitory G-protein, G_i)的偶联及下游的免疫应答^[29]。S1PR1 的脱棕榈酰化一方面由脱棕榈酰化酶 APT 催化,另一方面与其从 DHHC5 的解离也可能密切相关。

1.3 靶向 T 细胞免疫其他相关蛋白的棕榈酰化调控疾病进展

蛋白质棕榈酰化在肿瘤发生和发展中的重要性已经被阐明,棕榈酰化影响癌细胞的增殖和存活、细胞的侵袭和转移以及抗肿瘤免疫。棕榈酰基转移酶或棕榈酰化蛋白成为肿瘤治疗的潜在靶点。本文总结了棕榈酰化对几种在肿瘤中发挥重要作用的 T 细胞免疫相关蛋白的影响(如图 2),从而在理解其机制的基础上为特异性靶向肿瘤治疗提供新的见解。

1.3.1 靶向 PD-L1 棕榈酰化调控肿瘤免疫逃逸

程序性死亡受体配体 1(programmed death ligand 1, PD-L1)是一种关键免疫抑制分子,与程序性死亡受体 1(programmed cell death protein 1, PD-1)结合,从而抑制 T 细胞的增殖、细胞因子的产生和释放以及细胞毒性。许多肿瘤细胞利用这种机制来达到免疫逃逸的目的。现有靶向 PD-L1 的抗体药物通过阻断细胞表面的 PD-L1 而发挥作用。但 PD-L1 也存在于循环内涵体(recycling endosome)上,并可能重新填充到细胞膜上^[30],从而显著降低抗体药物的治疗效果。因此,降低 PD-L1 的细胞丰度是提高

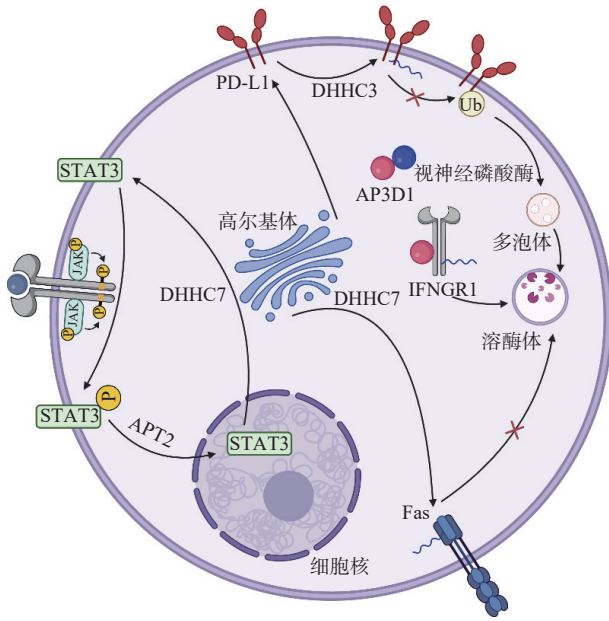


图 2 棕榈酰化在 T 细胞免疫疗法中的靶向策略

棕榈酰化增加 PD-L1、STAT3、Fas 和 IFNGR1 的质膜定位, 阻止蛋白靶向溶酶体的降解, “Ub”代表可发生泛素化 PD-L1: 程序性死亡受体配体 1; STAT3: 信号传导及转录激活蛋白 3; JAK: Janus 激酶; APT2: 酰基蛋白硫酯酶 2; Fas: 肿瘤坏死因子受体超家族成员 6; IFNGR1: 干扰素- γ 受体 1; AP3D1: 适配器相关蛋白复合物 3 亚基 $\delta 1$ PD-L1 抗体疗效的关键。

Yao 等^[31]发现, PD-L1 在其胞质结构域 Cys272 发生棕榈酰化, 发挥作用的棕榈酰基转移酶主要为 DHH3。棕榈酰化通过阻断 PD-L1 的泛素化, 抑制溶酶体对 PD-L1 的降解, 从而增强 PD-L1 的稳定性。棕榈酰化抑制剂 2-溴棕榈酸酯(2-bromopalmitate, 2-BP)处理显著增加了 PD-L1 的泛素化, 并促进泛素化的 PD-L1 结合到多泡体(multivesicular body, MVB)表面, 进一步转运至溶酶体而被降解。棕榈酰化的抑制也降低了肿瘤细胞表面 PD-L1 与 PD-1 的结合。在体外以及携带 MC38 肿瘤细胞的小鼠中, 通过 2-BP 抑制 PD-L1 棕榈酰化或沉默 DHH3 可下调 PD-L1 表达水平, 增加 CD8⁺ T 细胞浸润, 激活 T 细胞的抗肿瘤免疫, 抑制 MC38 肿瘤生长。

现有的治疗性抗体仅靶向暂时暴露于细胞表面的 PD-L1, 而靶向 PD-L1 的棕榈酰化可以同时降低细胞膜表面和细胞内 PD-L1 的表达水平, 为开发针对肿瘤免疫逃逸的治疗策略提供了新思路。

1.3.2 靶向 STAT3 棕榈酰化调控肿瘤发生发展
信号传导及转录激活蛋白 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的组成型激活与

多种肿瘤的发生和不良预后相关, 因此可作为肿瘤治疗的有效靶点。Zhang 等^[32]借助点击化学和 ABE 法两种方法证明了 DHH7 在 Cys108 棕榈酰化 STAT3。DHH7 对 STAT3 的棕榈酰化促进其由细胞核向 Janus 激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)定位的膜的募集, 进而促进 STAT3 自身磷酸化。酰基蛋白硫酯酶 2(APT2, 也称 LYPLA2)可以特异性识别磷酸化的 STAT3(p-STAT3), 使 p-STAT3 脱棕榈酰化, 然后从膜释放并转运到细胞核, 确保棕榈酰化-脱棕榈酰化循环在特定方向上进行。棕榈酰化或脱棕榈酰化的抑制都会影响 STAT3 的转录活性, 抑制下游基因的表达。

STAT3 是一种关键 Th17 细胞分化刺激因子。Th17 细胞与多种免疫病症如炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、高 IgE 综合征和关节炎相关^[33]。在特异性细胞因子刺激下, 幼稚 CD4⁺ T 细胞中的 STAT3 募集至质膜, 并被 JAK2 磷酸化。p-STAT3 促进下游靶基因(*RORC* 和 *IL-17A*)的表达以及 Th17 细胞的分化^[34]。研究发现, STAT3 的棕榈酰化-脱棕榈酰化循环可以增强 STAT3 活化并促进 Th17 细胞分化^[32]。在 IBD 患者尤其是溃疡性结肠炎患者中, *Zdhc7* 和 *Lypla2* mRNA 水平上调, STAT3 的下游靶基因 *RORC* 和 *IL17A* 表达水平也升高。在小鼠模型中, APT2 的药理学抑制或 *Zdhc7* 的敲除可以显著降低小鼠脾细胞中 Th17 细胞的水平^[32], 缓解 IBD 的症状。这揭示了 S-棕榈酰化调节细胞信号传导的一种新的模型, 对于理解许多 S-棕榈酰化事件的信号传导功能具有重要意义, STAT3 棕榈酰化-脱棕榈酰化循环可能成为 Th17 相关免疫病症的治疗靶标。

STAT3 信号传导也与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生发展相关。STAT3 的下游靶点缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF1 α)可以驱动 DHH7 的表达, DHH7 介导的棕榈酰化反过来又可以增强 STAT3 和 HIF1 α 的表达, 进而促进 HCC 细胞增殖, 这在 DHH7、STAT3 和 HIF1 α 之间产生了正反馈环^[35]。靶向这一信号环可以减缓小鼠的肿瘤生长, 具有治疗肝细胞癌潜力。

1.3.3 靶向 Fas 棕榈酰化稳定 Fas 死亡信号传导
Fas(CD95, TNFRSF6)是一种原型死亡受体, 属于肿瘤坏死因子受体超家族。Fas 在细胞凋亡信号传导

中发挥重要作用,与 Fas 配体(FasL, TNFSF6)结合后,可以启动信号级联反应,导致含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)激活并最终导致细胞死亡^[36]。肿瘤细胞可通过降低细胞表面的 Fas 受体表达水平逃避细胞死亡。

研究表明, Fas 在 Cys199 被 DHHC7 棕榈酰化。DHHC7 在高尔基体中表达^[37],决定了 Fas 棕榈酰化发生在高尔基体囊泡隔室中。Rossin 等^[38]的研究发现, DHHC7 介导的棕榈酰化可以增加 Fas 的质膜定位,保护 Fas 免于溶酶体的降解,维持其对表达 FasL 的杀伤细胞识别的敏感性。表达 Fas 棕榈酰化缺陷突变体的细胞中 caspase 8 的募集和激活受到损害,因此棕榈酰化有助于 Fas 诱导的死亡信号传导。

1.3.4 靶向 IFNGR1 棕榈酰化调控结直肠癌免疫逃逸 结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,发病机制尚未完全明确,涉及多因素相互作用^[39]。我国结直肠癌发病率在男性患者中居恶性肿瘤第 4 位,病死率居第 5 位,在女性患者中发病率居第 3 位,病死率居第 4 位,并且呈现上升趋势^[40]。免疫检查点阻断(immune checkpoint blockade, ICB)疗法可用于治疗结直肠癌,美国食品药品监督管理局已批准 Keytruda(pembrolizumab, 抗 PD-1 单克隆抗体)治疗已扩散至身体其他部位或不能手术切除的 MSI-H 或 dMMR 阳性结直肠癌患者^[41]。尽管如此,目前的免疫疗法对大多数结直肠癌患者的疗效并不好。

干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)信号传导途径在自发的和 ICB 诱导的抗肿瘤免疫中都发挥关键作用。IFN- γ 和抗原呈递信号传导通路相关基因的突变是肿瘤免疫逃逸的确定机制,然而这一现象在结直肠癌患者中并不常见,表明可能存在未知的免疫逃逸机制。IFN- γ 信号传导通路中多种关键蛋白(如 IFNGR 和 JAK/STAT1)都经历棕榈酰化、磷酸化和 SUMO 化等蛋白质翻译后修饰。一项最新研究提出了一种棕榈酰化依赖性的三聚体 optineurin-AP3D1-IFNGR1 分子级联模型^[42],为探索许多 S-棕榈酰化事件的生物活性提供新思路。

干扰素- γ 受体 1(IFN- γ receptor 1, IFNGR1)在 Cys122 处发生 S-棕榈酰化。棕榈酰化的 IFNGR1 与 AP3D1 结合并分选至溶酶体进行降解。2-BP 处理可以减弱 IFNGR1 和 AP3D1 之间的相互作用,减少 IFNGR1 在溶酶体中的定位,从而稳定其表

达。视神经磷酸酶(optineurin)是一种潜在的免疫相关基因,在某些人类肿瘤中表达降低。在小鼠 MC38 肿瘤模型中,视神经磷酸酶基因敲除导致肿瘤生长速度加快、体积变大和质量增加。通过测定 mRNA 水平和用放线菌酮(cycloheximide, CHX)阻断,发现视神经磷酸酶不影响 IFNGR1 的 mRNA 水平,而是结合 AP3D1,阻断 AP3D1 将棕榈酰化的 IFNGR1 招募到溶酶体,间接阻止 IFNGR1 的降解,从而维持 IFN- γ 和 MHC-I 信号传导的完整性。

因此, IFNGR1 棕榈酰化和视神经磷酸酶的缺失驱动结直肠癌中的免疫逃逸和内在免疫疗法抗性。IFNGR1 棕榈酰化的药理学抑制可与 ICB 疗法联合使用,以治疗结直肠癌等免疫原性差的肿瘤患者。

2 肽抑制剂靶向棕榈酰化修饰调控 T 细胞功能

糖皮质激素和环孢霉素等免疫抑制剂的长期使用会导致各种不良反应的产生,因此需要开发具有较少或无不良反应的新型免疫抑制剂。T 细胞在免疫应答中起着核心作用,并且它的激活对于细胞介导的免疫以及针对入侵病原体所需的其他免疫相关功能至关重要。因此,特异性抑制 T 细胞功能的药物有望成为比目前使用的免疫抑制剂更好的药物。蛋白-蛋白相互作用为药物设计提供了丰富的靶标,干扰关键蛋白-蛋白相互作用的肽已被证明可调控细胞功能并具有治疗潜力。

一些外周膜蛋白如 G α 亚基蛋白和 RAS 蛋白很容易发生突变,具有致癌的潜在可能。它们的致癌性与其结合质膜的能力有很大关系,而 S-棕榈酰化调控蛋白的质膜定位,因此在健康细胞转化为癌细胞的过程中发挥关键作用。在不破坏整个系统平衡的情况下抑制棕榈酰基转移酶,减少致癌蛋白的质膜定位有望降低其致病性。

Lck 是很多信号蛋白的上游靶标,主要在 T 细胞中表达,因此靶向 Lck 的药物将仅影响 T 细胞功能而对其他细胞的功能没有影响,可作为一个良好的药物设计靶点。许多 Lck 的小分子抑制剂已被证明为有效的免疫抑制剂,但是它们中大多数由于缺乏特异性导致不良反应而在药物开发的不同阶段终止。Gauthaman 等^[43]设计了一种由 10 个氨基酸组成的 GM 肽,其干扰 DHHC21 和 Lck 的相互作用,阻止 Lck 的膜定位,使其弥散在胞质中,并抑制 Lck 介导的 T 细胞活化的近端信号。GM 肽对

Erk1/2 磷酸化的抑制仅通过 Lck 介导的途径, 因此 GM 肽靶向细胞内特异性 PPI 而不干扰其他信号传导过程, 具有良好的安全性。

CPP-S1 是一种与 PD-L1 竞争性结合 DHHC 蛋白的肽, 为含有细胞穿透肽(cell-penetrating peptide, CPP)和 PD-L1 棕榈酰化基序(命名为 S1)的融合蛋白^[31]。CPP-S1 可通过竞争性抑制的方式降低 PD-L1 的棕榈酰化, 显著增加 PD-L1 的泛素化, 从而降低肿瘤细胞中内源性 PD-L1 的表达。体内毒性实验结果表明, 注射高剂量 CPP-S1 肽在胃中显示出一定程度的毒性并可能影响肝功能, 但大多数受试动物耐受毒性并在注射给药后两周依然存活, 为开发 PD-L1 抑制剂提供了一种新的途径。

3 结语与展望

近年来, 很多研究已将 S-棕榈酰化作为一种新的调控 T 细胞发育、增殖及功能的蛋白修饰, 并尝试以 DHHC 棕榈酰基转移酶为潜在靶点治疗 T 细胞免疫相关疾病。

抑制蛋白棕榈酰化, 一方面可以通过开发特异性的 DHHC 抑制剂, 另一方面可以通过设计和底物蛋白竞争性结合 DHHC 的多肽抑制剂。目前针对 S-棕榈酰化修饰最常用和有效的抑制剂是 2-BP, 但是它能够抑制大多数 DHHC 蛋白活性, 并且还与其他蛋白反应。考虑到 S-棕榈酰化在各种免疫途径以及其他系统如脑中的重要作用, 2-BP 并不具备临床应用的潜力。但由于 DHHC 家族成员的催化结构域非常相似, 开发特异性的 DHHC 抑制剂是非常具有挑战性的, 靶向具有序列多样性的 DHHC 的 C-端和 N-端可能是未来设计特异性 DHHC 抑制剂的有效策略。目前的研究主要集中在设计多肽抑制剂, 与底物竞争性结合 DHHC, 从而达到抑制底物棕榈酰化的目的。由于每种 DHHC 都作用于多种底物, 特异性抑制某种 DHHC 的功能产生的影响可能是多方面的, 还需要进一步研究探索。

References

- [1] Jiang H, Zhang XY, Chen X, et al. Protein lipidation: occurrence, mechanisms, biological functions, and enabling technologies[J]. *Chem Rev*, 2018, **118**(3): 919-988.
- [2] De I, Sadhukhan S. Emerging roles of DHHC-mediated protein S-palmitoylation in physiological and pathophysiological context[J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, **97**(5): 319-338.
- [3] Chen JJ, Fan Y, Boehning D. Regulation of dynamic protein S-acylation[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, **8**: 656440.
- [4] Zhang YQ, Qin ZR, Sun WH, et al. Function of protein S-palmitoylation in immunity and immune-related diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 661202.
- [5] Stix R, Lee CJ, Faraldo-Gómez JD, et al. Structure and mechanism of DHHC protein acyltransferases[J]. *J Mol Biol*, 2020, **432**(18): 4983-4998.
- [6] Shen ZC, Xia ZX, Liu JM, et al. APT1-mediated depalmitoylation regulates hippocampal synaptic plasticity[J]. *J Neurosci*, 2022, **42**(13): 2662-2677.
- [7] Han SZ, Wang RK, Zhang YN, et al. The role of ubiquitination and deubiquitination in tumor invasion and metastasis[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, **18**(6): 2292-2303.
- [8] Chum T, Glatzová D, Kvičalová Z, et al. The role of palmitoylation and transmembrane domain in sorting of transmembrane adaptor proteins[J]. *J Cell Sci*, 2016, **129**(15): 3053.
- [9] Jin JY, Zhi XL, Wang XH, et al. Protein palmitoylation and its pathophysiological relevance[J]. *J Cell Physiol*, 2021, **236**(5): 3220-3233.
- [10] Zhang YL, Yan L, Ju FY, et al. Research progress of palmitoylation in non-alcoholic fatty liver disease and related liver diseases[J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2023, **54**(5): 536-543.
- [11] Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(8): 485-497.
- [12] Shah K, Al-Haidari A, Sun JM, et al. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 412.
- [13] Au-Yeung BB, Shah NH, Shen L, et al. ZAP-70 in signaling, biology, and disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, **36**: 127-156.
- [14] Tousley AM, Rotiroti MC, Labanieh L, et al. Co-opting signalling molecules enables logic-gated control of CAR T cells[J]. *Nature*, 2023, **615**(7952): 507-516.
- [15] Katz ZB, Novotná L, Blount A, et al. A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli[J]. *Nat Immunol*, 2017, **18**(1): 86-95.
- [16] Bawden E, Gebhardt T. The multifaceted roles of CD4⁺ T cells and MHC class II in cancer surveillance[J]. *Curr Opin Immunol*, 2023, **83**: 102345.
- [17] Frago R, Ren DJ, Zhang XP, et al. Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling[J]. *J Immunol*, 2003, **170**(2): 913-921.
- [18] Yurchak LK, Sefton BM. Palmitoylation of either Cys-3 or Cys-5 is required for the biological activity of the Lck tyrosine protein kinase[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**(12): 6914-6922.
- [19] Fan Y, Shayahati B, Tewari R, et al. Regulation of T cell recep-

- tor signaling by protein acyltransferase DHHC21[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, **47**(8): 6471-6478.
- [20] Lo WL, Shah NH, Ahsan N, *et al.* Lck promotes Zap70-dependent LAT phosphorylation by bridging Zap70 to LAT[J]. *Nat Immunol*, 2018, **19**(7): 733-741.
- [21] Tewari R, Shayahati B, Fan Y, *et al.* T cell receptor-dependent S-acylation of ZAP-70 controls activation of T cells[J]. *J Biol Chem*, 2021, **296**: 100311.
- [22] Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes[J]. *Nature*, 1995, **376**(6539): 435-438.
- [23] Zhang W, Triple RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation[J]. *Immunity*, 1998, **9**(2): 239-246.
- [24] Larghi P, Williamson DJ, Carpier JM, *et al.* VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular Lat at TCR-activation sites[J]. *Nat Immunol*, 2013, **14**(7): 723-731.
- [25] Morrison E, Wegner T, Zucchetti AE, *et al.* Dynamic palmitoylation events following T-cell receptor signaling[J]. *Commun Biol*, 2020, **3**(1): 368.
- [26] Fredericks GJ, Hoffmann FW, Rose AH, *et al.* Stable expression and function of the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(46): 16478-16483.
- [27] Kamp ME, Liu YT, Kortholt A. Function and regulation of heterotrimeric G proteins during chemotaxis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(1): 90.
- [28] Roy R, Alotaibi AA, Freedman MS. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators for multiple sclerosis[J]. *CNS Drugs*, 2021, **35**(4): 385-402.
- [29] Badawy SMM, Okada T, Kajimoto T, *et al.* DHHC5-mediated palmitoylation of S1P receptor subtype 1 determines G-protein coupling[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 16552.
- [30] Wu YL, Chen WY, Xu ZP, *et al.* PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition[J]. *Front Immunol*, 2019, **10**: 2022.
- [31] Yao H, Lan J, Li CS, *et al.* Inhibiting PD-L1 palmitoylation enhances T-cell immune responses against tumours[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, **3**(4): 306-317.
- [32] Zhang MM, Zhou LX, Xu YJ, *et al.* A STAT3 palmitoylation cycle promotes T_H17 differentiation and colitis[J]. *Nature*, 2020, **586**(7829): 434-439.
- [33] Korn T, Bettelli E, Oukka M, *et al.* IL-17 and Th17 cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, **27**: 485-517.
- [34] Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, **15**(4): 234-248.
- [35] Jiang Y, Xu YJ, Zhu CL, *et al.* STAT3 palmitoylation initiates a positive feedback loop that promotes the malignancy of hepatocellular carcinoma cells in mice[J]. *Sci Signal*, 2023, **16**(814): eadd2282.
- [36] Timmer T, de Vries EGE, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application[J]? *J Pathol*, 2002, **196**(2): 125-134.
- [37] Ohno Y, Kihara A, Sano T, *et al.* Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1761**(4): 474-483.
- [38] Rossin A, Durivault J, Chakhtoura-Feghali T, *et al.* Fas palmitoylation by the palmitoyl acyltransferase DHHC7 regulates Fas stability[J]. *Cell Death Differ*, 2015, **22**(4): 643-653.
- [39] Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management[J]. *Gastroenterology*, 2022, **162**(3): 715-730. e3.
- [40] Xia CF, Dong XS, Li H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J*, 2022, **135**(5): 584-590.
- [41] André T, Shiu KK, Kim TW, *et al.* Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, **383**(23): 2207-2218.
- [42] Du W, Hua F, Li X, *et al.* Loss of optineurin drives cancer immune evasion via palmitoylation-dependent IFNGR1 lysosomal sorting and degradation[J]. *Cancer Discov*, 2021, **11**(7): 1826-1843.
- [43] Gauthaman A, Jacob R, Pasupati S, *et al.* Novel peptide-based inhibitor for targeted inhibition of T cell function[J]. *J Cell Commun Signal*, 2022, **16**(3): 349-359.



[专家介绍] 童玥, 博士, 硕士生导师, 昆士兰大学访问学者。主要研究方向为生物大分子药物研发。主持完成国家 863 项目“青年科学家”专题、国家自然科学基金青年项目、江苏省自然科学基金青年项目等课题。作为主要参加者参与“重大新药创制”科技重大专项、国家自然科学基金面上项目多项, 发表 SCI 论文 20 余篇, 授权专利 1 项。参编教材 4 部, 参与讲授的课程入选国家级一流本科课程、江苏省一流本科课程。